

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

AUTOR: WAMBERTO VIEIRA MACIEL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE RATOS TRATADOS COM FLUOXETINA,
INIBIDOR SELETIVO DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA.

ORIENTADOR: PROF. DIÓGENES LUIS DA MOTA

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ANATOMIA PATOLÓGICA.

DATA: 23/07/2004

BANCA EXAMINADORA:

PROF. ALEXANDRE MOTA BITTENCOURT

PROFA. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

PROF. JOAQUIM EVÊNCIO NETO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE RATOS TRATADOS COM INIBIDOR
SELETIVO DE RECAPTURA DA SEROTONINA.**

WAMBERTO VIEIRA MACIEL

RECIFE - PE

2004

WAMBERTO VIEIRA MACIEL

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE RATOS TRATADOS COM INIBIDOR
SELETIVO DE RECAPTURA DA SEROTONINA.**

Dissertação apresentada ao Mestrado de Anatomia Normal e Patológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Anatomia Normal e Patológica, área de concentração em Morfologia Aplicada.

ORIENTADOR: DIÓGENES LUÍS DA MOTA

RECIFE - PE

2004

“Lembre-se que cada um é um ser
diferente com suas virtudes e seus
defeitos, afinal perfeito só
DEUS.”

Titãs

DEDICATÓRIA

Dedicatória

... a Deus

"Pela sua eterna benção e seu infinito amor. Pela sua constante presença e força e por iluminar todos os meus passos."

... aos meus pais **João e Maria,**

que orientaram minha vida e cujos exemplos sempre os procurei seguir. Por terem me ensinado a trilhar o caminho do bem e da retidão moral. Que Deus os abençoe.

... à minha querida esposa **Shirley,**

Pelo seu grande amor, sincera amizade e imenso carinho. Por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me acalmando nos momentos de estresse com seus abraços, beijos e suas palavras amorosas que me serviram de força para continuar lutando.

... aos meus queridos filhos **Teté, Juba e Neta,**

por tê-los ao meu lado, sempre estando presentes em todos os momentos da minha vida..

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

- Em especial, ao Prof. Dr. Diógenes Luís da Mota, pelo grande apoio e incentivo nesta fase importante da minha vida. E por ter conduzido a orientação da pesquisa com seriedade, responsabilidade e respeito. Meus sinceros agradecimentos.
- À Faculdade de Odontologia de Caruaru, na pessoa de Márcia Charret (Presidenta), de Petrônio Martelli (Coordenador do curso de Odontologia), e os demais professores e funcionários pela colaboração e incentivo que mim concederam para elaboração deste trabalho. Obrigado!
- Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães na pessoa da Dra. Regina Célia e da Bióloga Especialista Elisângela do Departamento de Biologia Celular e ultraestrutura, por terem sido importantes em uma das etapas desta conquista, meus agradecimentos.
- Aos colegas da especialização e do mestrado, vocês compartilharam, de uma forma ou outra, do meu trabalho, incentivando, participando e dividindo esforço e conhecimentos, muito obrigado.

- Ao Prof. Raul Manhães de Castro. Pelo exemplo de dedicação, de doação, dignidade pessoal e pelo amor que faz, que tanto contribui para minha formação, meu afeto, minha homenagem e meu muito obrigado.
- A Pesquisadora Tereza Deiró, não só por ter permitido a utilização dos animais, mas por ter sido uma verdadeira incentivadora deste e aos futuros trabalhos, meus agradecimentos.
- Á Mário através de sua experiência, tornou-me capaz de realizar este trabalho, dando-me força para ultrapassar os obstáculos e perseverança para concluir este trabalho. Muito obrigado.
- Aos funcionários do Mestrado de morfologia, por estarem sempre dispostos a ajudar, especialmente a Alex pelo apoio dado nos momentos de dificuldades.

... enfim a TODOS que contribuíram para realização desse trabalho.

A minha eterna gratidão

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	22
2.0	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	A morfogênese das Glândulas Salivares	27
2.2	Porções Terminais e Sistema Ductal das Glândulas Salivares	29
2.3	Porções Terminais das Glândulas submandibulares	30
2.4	Sistema Ductal das Glândulas Salivares	32
2.5	Interações das Glândulas Salivares com o Sistema Nervoso	34
2.7	Serotonina e Sistema Serotoninérgico	36
3.0	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivos gerais e específico	43
4.0	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	População do Estudo	45
4.2	Processamento Histológico das Glândulas submandibulares	48
4.3	Análise histomorfométrica	50
4.4	Análise Estatística	51
5.0	RESULTADOS	52
6.0	DISCUSSÃO	58
7.0	CONCLUSÕES	62
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9.0	ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5 – Hidroxindol Acético
5-HT	5 – Hidroxitriptamina ou Serotonina
CAMP	Adenosinammonofosfato Cíclico
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Experimental
IMAO	Inibidores da Monoaminoxidase
ISRS	Inibidor Seletivo de Recaptura da Serotonina
NGF	Nerve Growth Factor
PCPA	p-Clorofenilalanina
PLS	Promotores de Liberação de Serotonina
SC	Sub-cutânea
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SS	Sistema Serotoninérgico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Composição das amostras obtidas

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 PESO MÉDIO CORPORAL DE RATOS (75 DIAS)

Gráfico 2 Peso médio da glândula submandibular esquerda de ratos (75 dias)

Gráfico 3 Médias das áreas e dos perímetros dos ductos estriados segundo os grupos experimental e controle dos animais com 22 dias.

Gráfico 4 Médias das áreas e dos perímetros dos ácinos segundo grupos experimental e controle dos animais com 22 dias.

Gráfico 5 Médias das áreas e dos perímetros dos ductos estriados segundo os grupos experimental e de controle dos animais com 75 dias.

Gráfico 6 Médias das áreas e dos perímetros dos ácinos segundo grupos experimental e controle dos animais com 75 dias.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo controle com 22 dias (objetivas de 40x)
- Figura 02 Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo experimental com 22 dias (objetivas de 40x)
- Figura 03 Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo controle com 75 dias (objetivas de 40x)
- Figura 04 Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo experimental com 75 dias (objetivas de 40x)

RESUMO

RESUMO

A serotonina (5-Hidroxitriptamina) é uma amina biogênica que exerce inúmeros papéis regulando e modulando a morfogênese da cabeça e pescoço. O objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia e as possíveis alterações morfométricas nas glândulas submandibulares em ratos tratados com inibidores seletivos de recapturas da serotonina - ISRS no período de 22 e 75 dias. Ratos Wistar foram separados desde o nascimento até 21º dia em quatro grupos: Grupos experimentais (GE) submetidos diariamente à ingestão de fluoxetina (10µg/g de peso) e Grupos Controles (GC) que ingeriram solução salina (0,9% de NaCl) por via subcutânea. Ambos os grupos foram sacrificados em dois períodos: o 22º (GE-22 e GC-22) e o 75º (GE-75 e CG-75) dias de vida, para que fossem retiradas as glândulas submandibulares e obter cortes histológicos corados em HE. Áreas e diâmetros médio dos ácinos e dos ductos foram avaliados através da análise morfométrica, observando-se que entre os períodos estudados, o peso corporal médio entre os grupos exibiu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo o GE 75 menor quando comparado ao seu controle; não houve diferença estatisticamente significativa entre o peso médio das glândulas esquerda e direita em nenhum dos grupos, exceto quando se comparou isoladamente as glândulas esquerda ou direita entre os grupos estudados, observando-se uma diferença estatística entre os grupos com 75 dias de tratamento. Não foram observadas diferenças significantes entre a área e o perímetro dos ductos ou dos ácinos quando comparadas à lateralidade das glândulas, porém, quando se comparou o GE22 com o GC22, constatou-se que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na área e perímetro dos ductos estriados nos animais tratados com fluoxetina. Analisando os ácinos glandulares aos 22 dias, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes, porém,

observou-se uma importante redução ($p < 0,05$) da área e perímetro médios dos ductos estriados e dos ácinos glandulares no GE 75 quando comparado ao GC 75.

Palavras-chaves: Fluoxetina, inibidor seletivo de recaptura de serotonina.

ABSTRACT

ABSTRACT

Histomorphometrical studies of the salivary glandules of mice treated with serotonin reuptake selective inhibitor - SRSI.

Serotonina (5-HIDROXITRIPTAMINA) is a biogenic amine which plays several roles regulating and modulating the shaping of the head and neck. At the present study, we aimed at evaluating possible histological changes at the development of submandibular glandules of mice chronically exposed to a selective inhibitor of the reuptake of serotonin (Fluoxetine). Wistar mice were separated in four groups: Experimental groups (GE) daily undergone through fluoxetine ingestion (10µg/g heavy) since their 21st day of birth. From hence, the experimental group was sacrificed in two terms: 22° (GE-22), and 75° (GE-75) of life and control group (GC-22 and GC-75) whose animals ingested saline solution (0,9% of NaCl) through subcutaneous via. During all the treatment, all animals were weighed. On the respective dates, the mice were sacrificed and their submandibular glandules were retrieved afterwards, and then stored withing fixing solution of formalin at 10% up to the moment of microtomy. Histological cuts were obtained and colored in HE. For morphometrical analyses, the areas and the mean diameters of the acini and of the ducts were evaluated. Considering preliminar results obtained,, we can see that between both studied terms, the bodily mean weight of the mice between the groups exhibited differences statistically significant $p < 0,05$, only at the GE 75 smaller when compared to the control group GC 75; as to the mean weight of submandibular glandules, it has not shown difference between the left and right glandules at none of the groups studied (GC22, GE22, GC75 e GE75), nevertheless, when individually compared, left or right submandibular glandules between experimental groups in

defferent times of treatment (GE22 and GE75) and control group (GC22 and GC75) it is observed a statistical difference between 75-day treatment groups.

As to morphometrical analyses of the 22days-old animals, statistically significant differences were seen, between the area and perimeter of ducts between groups GE 22 and GC22. No difference between the acines. As to the morphometrical analyses of 75-days-old animals, an important reduction of the area and perimeter was observed, of both ducts and glandular acines between GE75 and GC75.

It is concluded that the fluoxetine treatment delays the glandular development, probably due to interactions among the fluoxetine and receivers

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O papel da serotonina sobre o desenvolvimento de tecidos, durante a embriogênese, foi observado pela primeira vez por Palén; Thörneby; Emmanuelsson, quando da observação da ação de drogas na síntese e liberação da serotonina ou na avaliação de receptores serotoninérgicos, acarretando perturbações no crescimento de vários tecidos, inclusive no sistema nervoso (MANHÃES de CASTRO , 1998).

Comment: Verificar o ano de publicação do artigo de Pálen...

Somente a partir da descoberta dos numerosos tipos e subtipos de receptores serotoninérgicos e da identificação das funções de cada um deles, é que cresceu o interesse pela neurofarmacologia da serotonina, devido ao fato da maioria destes modular a atividade de enzimas ou alterar a permeabilidade de canais iônicos na membrana celular dos vertebrados (HOYER et al., 1994; BARNES e SHARP, 1999; HUANG, 2004).

Comment: Artigo: Serotonina: uma história permeada de avanços tecnológicos em neurociências. Castro et al. (1999)

Uma vez que o papel da serotonina no processo de morfogênese das estruturas crânio-faciais encontra-se determinado, e que os Inibidores Seletivos de Recapturas da Serotonina - ISRS, que interagem com receptores celulares específicos para o 5 – Hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT), provocam e promovem alterações em diversos órgãos estudados o que suscita o questionamento sobre, quais os efeitos ISRS sobre o desenvolvimento da glândula submandibular.

O tratamento com ISRS durante a primeira semana de vida pós-natal tem demonstrado experimentalmente alterações morfológicas em diversos órgãos (MAGALHÃES, 2000). Segundo a autora sugere que a manipulação do sistema serotoninérgico através da utilização de um ISRS no período de maior

vulnerabilidade neural retarda o crescimento da caixa craniana, onde a mesma recomenda maiores cuidados na utilização de ISRS Antidepressivos (anórexicos), em organismos jovens. Também foi verificadas alterações morfológicas no jejuno segundo trabalho de Silveira (2000), onde o referido autor relata que houve uma atrofia as estruturas do jejuno e conseqüentemente redução na absorção de nutrientes, acarretando prejuízos ao desenvolvimento de todo o organismo dos ratos tratados com antidepressivo, provavelmente interferindo nos receptores celulares para serotonina.

Além disso, os efeitos de agressões farmacológicas sobre o sistema serotoninérgico, no período de rápido desenvolvimento neural e suas conseqüências sobre as expressões comportamentais precisam ser investigadas, já que este sistema promove ou modula uma ampla variedade de funções do sistema nervoso central (CHOPING; ORET e BRILEY, 1994; DEIRÓ, 2004).

Apesar da morfologia e fisiologia das células das glândulas salivares serem objetos de exaustivos estudos, existem ainda pontos obscuros a serem elucidados acerca das possíveis repercussões de alguns ISRS em fase especiais do desenvolvimento da vida, dentre eles a serotonina. (MORITA, 1999)

Entretanto, no que se refere aos estudos morfométricos, estes são escassos, existindo assim poucos dados morfoquantitativos que possam expressar possíveis alterações teciduais após manipulação farmacológica no período de vida pós-natal, sob análise experimental. A microscopia óptica permitirá uma análise experimental mais precisa tanto qualitativa como quantitativamente das várias células existentes nas glândulas submandibulares de ratos adultos e neonatos. (MANDARIN-DE-LACERDA, 1995).

Comment: Artigo Tratamento inibidor de recaptura de serotonina no período neonatal, reduz agressividade intraespecífica em ratos adultos. Castro et al. 1998

Este trabalho teve como objetivo estudar a morfologia e as possíveis alterações morfométricas nas glândulas submandibulares em ratos tratados com Inibidor Seletivo de Recaptura da Serotonina - ISRS com 22 e 75 dias de vida pós-natal.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

A Morfogênese das Glândulas Salivares

O desenvolvimento de todas as glândulas salivares é similar (KIM, 1994). Uma glândula salivar origina-se como um espessamento focal do epitélio bucal que cresce para o ectomesênquima subjacente, para formar um pequeno broto conectado à superfície por um cordão epitelial. Ao mesmo tempo, células do ectomesênquima se condensam em torno desse broto, sendo tal fase do desenvolvimento semelhante à de um broto dentário em formação (DOINE, 1994; KIM, 1994).

Segundo os autores acima citados, o ectomesênquima tem um papel importante no desenvolvimento das glândulas salivares, tanto na morfogênese quanto na citodiferenciação da glândula. Vários experimentos de recombinação têm mostrado que a presença do ectomesênquima do primeiro arco é essencial ao completo desenvolvimento da glândula. Todavia, o processo que determina a diferenciação dos tipos celulares que vão formar a porção terminal não é conhecido (DOINE, 1994; KIM, 1994).

As primeiras glândulas humanas a se desenvolverem são as parótidas, que aparecem no início da 6ª semana. Em torno da 10ª semana começam a se originar os ductos e as extremidades destes cordões que se diferenciam em ácinos. A cápsula e o tecido conjuntivo se desenvolvem a partir do mesênquima circundante. A Atividade secretória inicia-se na 16ª semana (COSSA, 2000).

No entanto, Bassi e colaboradores (1992) relataram que as glândulas parótidas de ratos recém-nascidos são totalmente imaturas, ou seja, estão formadas

Comment: Artigo Bassi; Hernandes; Stipp; Taga (1992)

por estruturas celulares sólidas com formato cilíndrico, exibindo nas suas extremidades estruturas esféricas, também sólidas.

As glândulas submandibulares dos roedores completam seu desenvolvimento no período pós-natal (FERREIRA, 1994).

Nesta fase passaram por um processo complexo de diferenciação e crescimento, regulados por diversos fatores, dentre os quais a ação androgênica tem sido um dos mais investigados (BALL, 1974).

Jacob e Lesson (1959), descreveram a inexistência de ácinos nas glândulas submandibulares de rato ao nascimento e a presença de estruturas transitórias por eles denominadas túbulos terminais. Relataram ainda que a formação de ácinos ocorre a partir destes túbulos terminais.

As submandibulares aparecem na oitava semana, cerca de 2 semanas mais tarde que as outras glândulas salivares. Elas se desenvolvem a partir de múltiplos brotos epiteliais endodérmicos no sulco paralingual. Estes brotos se ramificam e se canalizam, formando 10 a 12 ductos, que se abrem independentemente no assoalho da boca (TAGA, 1998).

Nos primeiros 20 dias de vida pós-natal ocorre diferenciação dos ácinos e do sistema de ductos, e intensa atividade proliferativa em todos compartimentos glandulares. Em seguida, ocorre uma queda brusca na atividade proliferativa e concomitantemente as células parenquimatosas aumentam significativamente os seus volumes individuais, de tal modo que aos 30°- 40° dias de vida pós-natal as glândulas exibem padrão morfológico do animal adulto (REEDMAN, 1971; TAGA e SESSO, 1978; SREEBNY, 1987).

Deste modo, o crescimento das massas das glândulas submandibulares do rato durante a vida pós natal, deve-se à atividade proliferativa e ao aumento do tamanho das células acinosas (FERREIRA, 1994).

O suprimento nervoso é feito tanto pelo simpático quanto pelo parassimpático e a inervação parece ser necessária para que ocorra a diferenciação funcional da glândula, sendo que, a inervação simpática é relacionada à diferenciação acinar e a parassimpática, ao crescimento total, e produção de uma secreção aquosa; com grande quantidade de macromoléculas, especialmente mucina (MANDEL, 1987; GARRET, 1993).

Os componentes macromoleculares da saliva são secretados por meio de um processo complexo conhecido como acoplamento estímulo-secreção, provocando a fosforilação de proteínas, movimento do grânulo secretor e, finalmente, a exocitose (DAWES, 1990).

Scott (1977), estudando os ductos da glândula submandibular de humanos idosos, verificou que o sistema ductal glandular aumentava com a idade.

Andrew (1949a) estudou os efeitos do envelhecimento sobre a glândula submandibular do rato, cujas idades variaram entre 21 e 170 dias, observou células aberrantes nos alvéolos serosos, cujos núcleos apresentavam alterações marcantes com núcleos picnóticos e desorganizados, além de infiltrado inflamatório linfocitário.

Porções Terminais e Sistema Ductal das Glândulas Submandibulares

As glândulas salivares possuem um parênquima com uma série de ductos que confluem para as porções secretoras terminais, semelhante a um cacho de

uvas, onde as uvas representam as porções secretoras terminais, e os caules, o sistema de ductos - ductos estriados e ductos intercalares (KIM, 1994; MARTINEZ-MADRIGAL, 1998).

Porções Terminais das Glândulas Submandibulares

As porções terminais, observadas nos cortes histológicos, mostram grande diversidade em tamanho, forma e número de células, variando a forma de um simples contorno circular a tubular com um contorno poligonal multilobulado. (MARTINEZ-MADRIGAL, 1998)

Três tipos celulares podem ser encontrados na extremidade da porção secretora: células mucosas, células serosas e células mioepiteliais. Porém as células secretoras, em uma glândula salivar, são classificadamente descritas como serosas ou mucosas (REEDMAN, 1993; TANDLER e PHILLIPS, 1993; TANDLER, 1993).

Uma unidade secretora terminal pode ser constituída por células serosas, células seromucosas ou, quando presente uma semi-lua, pelos dois tipos de células ao mesmo tempo (TANDLER e PHILLIPS, 1993).

Com o aumento de resolução fornecido pelo microscópio eletrônico, as células seromucosas mostram todas as características de uma célula especializada na síntese, armazenamento e secreção das proteínas (TANDLER e PHILLIPS, 1993). As células serosas também secretam quantidades demonstráveis de polissacarídeos, sendo, portanto, essas células, na realidade, células seromucosas (TANDLER, 1993; TANDLER e PHILLIPS, 1993).

As células mucosas também são bem-adaptadas à produção, armazenamento e secreção de material protéico. Os produtos de secreção das células seromucosas e células mucosas são diferentes, pois elas apresentam um componente enzimático menor e proteínas ligadas a maiores quantidades de carboidratos que formam mucinas (PINKSTAFF, 1993).

Ressalta-se que, as células seromucosas e mucosas empacotam seus produtos de secreções em grânulos, embora existam referências de variações estruturais nesses grânulos (PINKSTAFF, 1993; TANDLER, 1993).

Tandler e Phillips, (1993) e Tandler, (1993) citam que a porção secretora também é conhecida como ácino, porém, segundo os autores o uso desse termo é confuso, porque a porção secretora serosa esférica era chamada de ácino e a porção secretora de muco, era a unidade secretora tubular. Como também, quando a porção tubular é cortada oblíqua ou transversalmente, observa-se o aspecto acinar. Entretanto, se o termo ácino for usado para descrever a morfologia da glândula geralmente é classificada como ácino esférico ou ácino tubular.

Pardini e Taga (2000), descreveram que as glândulas submandibulares de ratos e camundongos exibem dois tipos de estruturas secretórias: ácinos e túbulos granulares contorcidos. Enquanto o ácino se desenvolve primariamente durante o primeiro mês de vida pós-natal, os túbulos contorcidos granulares desenvolvem-se depois do segundo mês de desenvolvimento.

Na glândula salivar normal as células mioepiteliais estão situadas dentro da membrana basal circundando as células luminas onde se apresentam fusiformes e circundando as células adquirem aparência estrelada. A microscopia de luz a célula mioepitelial na glândula normal é identificada pelo seu posicionamento

uma vez que mesmo através de métodos específicos de coloração é difícil a sua individualização (BATSAKIS, 1985; ARAUJO, 1990).

Somente seus núcleos são visíveis nos cortes processados para microscopia óptica corados com H&E. Cada célula consiste em um corpo central (onde o núcleo está situado), a partir do qual se irradiam cerca de quatro a oito prolongamentos que envolvem o longo eixo da unidade secretora. (ARAUJO, 1990)

Pela extensão dos prolongamentos, existem muitos microfilamentos (miofilamentos) que freqüentemente se agregam, formando corpos densos. A identificação precisa das células mioepiteliais em cortes histológicos é possível pelo uso de técnicas de imunofluorescência, as quais permitem a visualização dos seus microfilamentos (COSSA, 2000).

Os componentes do tecido conjuntivo das glândulas salivares é o mesmo de outras partes do corpo e compreende fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células adiposas e plasmócitos, todos incluídos em uma matriz extracelular de fibras colágenas e uma substância fundamental de glicoproteínas e proteoglicanas. O estroma de tecido conjuntivo das glândulas salivares serve para passagem de nervos e vasos sanguíneos.(CUTLER, 1989).

Sistema Ductal das Glândulas Salivares

A rede de ductos contém três tipos: intercalares, estriados e terminais. O sistema de ductos participa ativamente na produção e modulação da saliva, não sendo, portanto, apenas uma simples forma de conduzi-la para o meio externo (TANDLER , 1993).

Nas glândulas salivares dos mamíferos, a saliva primária secretada pelo ácino (célula secretora), flui através de um sistema de ductos formado pelos ductos intercalares, ductos estriados, ductos excretores intraglandulares e o ducto excretor principal e então o fluido alcança a cavidade bucal (MARTINEZ-MADRIGAL, 1989).

Martinez-Madrigal (1989) descreve que a nível de microscopia eletrônica, as células do ducto estriado exibem características estruturais semelhantes às exibidas pelo túbulo contorcido renal, e ou células que transportam íon ativamente.

Álvares e Sesso (1985) relataram a presença destes túbulos terminais em glândulas submandibulares de rato e camundongos, ao nascimento, o que foi posteriormente confirmada (BRUSCHI, 1984).

A secreção das porções secretoras passa, inicialmente, pelos ductos intercalares, os quais tem pequeno diâmetro e são revestidos por células cuboidais. A atividade funcional das células dos ductos intercalares não é bem-compreendida (BRUSCHI, 1984).

Os ductos intercalares continuam-se com os ductos estriados. Estes são revestidos por células cilíndricas e essas estriações são observadas pela microscopia eletrônica como profundas indentações na porção basal da membrana plasmática da célula; rico em mitocôndrias (REEDMAN, 1971). Os ductos estriados são sempre circundados por grande número de pequenos vasos sanguíneos orientados longitudinalmente (GARRET, 1993).

A estrutura especializada dos ductos estriados implica em uma função também especializada. Eles modificam as secreções que os atravessa. Chamamos a atenção para o fato de que esse líquido é caracterizado por um conteúdo protéico (isotônico), um alto conteúdo de sódio (hipertônico) e um baixo conteúdo de potássio

(hipotônico). À medida que atravessa o ducto estriado, o líquido modifica-se, em geral, para um estado hipotônico (TANDLER, 1993).

Segundo Taga (1993), quando a saliva passa através do ducto estriado, ela sofre mudanças perceptíveis no conteúdo iônico e na osmolaridade de forma quantitativa e qualitativa.

Após passar pelos ductos estriados, o líquido salivar é secretado para cavidade oral através dos ductos excretorios terminais. A histologia desses ductos varia. Próximo aos ductos estriados, eles são revestidos por epitélio pseudo-estratificado, quando os ductos excretorios terminais se aproximam da cavidade oral, seu epitélio modifica-se num verdadeiro epitélio estratificado e se funde com o orifício ductal da cavidade oral (YOUNG, 1978).

Os ductos excretorios principais modificam a saliva, alterando sua concentração eletrolítica, tornando-a hipotônica (TANDLER, 1993).

Interações das Glândulas Salivares com o Sistema Nervoso

Na maioria das glândulas, a atividade secretora é controlada por impulsos que alcançam as células através dos nervos. A inervação da glândula salivar é especialmente complexa; informações atualmente disponíveis, obtidas a partir de estudos em glândulas de várias espécies animais, indicam que as glândulas recebem nervos secretomotores pós-ganglionares de ambas as fontes, simpática e parassimpática, embora existam grandes variações entre as espécies, entre as glândulas e entre os tipos celulares em uma mesma glândula. Em relação a essa

complexidade nos padrões de inervação, é possível reconhecer (no mínimo, morfológicamente) dois padrões de inervação (EMMELIN 1987).

Os nervos que entram nas glândulas salivares seguem os vasos sanguíneos e ramificam-se em feixes progressivamente menores, até formarem um plexo final adjacente ao parênquima terminal. Nesse plexo, os nervos consistem em axônios amielinizados, incluídos no citoplasma da célula de Schwann (GARRET, 1993).

A partir daí, são distribuídos para as arteríolas musculares, as células das porções secretoras, as células mioepiteliais, assim como as células dos ductos intercalares e estriados (CUTLER 1973).

O fluxo de saliva é totalmente controlado pela estimulação nervosa. Em geral, considera-se que a estimulação Beta-adrenérgica (simpática) induza a mecanismo de secreção protéica, enquanto a Alfa-adrenérgica e a Colinérgica regulem a liberação de água e eletrólitos (SREEBNY, 1987). Não há inervação inibitória direta das glândulas salivares.

A boca “seca”, condição que resulta da inibição simpática como parte da resposta ao tudo ou nada, é explicada pela influência direta dos centros superiores sobre os centros modulares (TORN, 1989).

A estimulação da atividade celular é conseguida pela liberação de neurotransmissores, principalmente da norepinefrina e acetilcolina. Essas substâncias, encontradas em pequenas estruturas vesiculares de aproximadamente 40/nm de diâmetro, aparece agranulares nos axônio colinérgicos e granulares nos axônios adrenérgicos. Podem-se encontrar, também, nos axônios, vesículas granulares maiores (80 a 120/nm), mais dispersas, com a porção central densa e que parecem ser o local de armazenamento de vários outros peptídeos

neurotransmissores, tais como a substância P e o peptídeo intestinal vasoativo (GARRET, 1993).

Embora haja evidência de que os transmissores convencionais sejam liberados em quantidades submínimas sem qualquer estimulação, quando estimulados, os neurônios parecem ser capazes de liberar quantidades inesgotáveis de acetilcolina e norepinefrina (EMMELIN 1987).

Quando o transmissor é liberado, afeta a célula parenquimal, ligando-se aos receptores da superfície celular e iniciando mecanismos de sinalização dentro da célula. Dois desses mecanismos ocorrem: um envolve a geração de adenosinamono-fosfato cíclico (cAMP), e o outro, a quebra de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (com a quebra de produtos que funcionam como mensageiros intracelulares) (SHEFLIN, 1996).

Finalmente, além da regulação por neurotransmissores, os hormônios igualmente exercem níveis variados de regulação na glândula salivar. Entre os hormônios pode-se incluir os estrogênios, os androgênios, os glicocorticóides e os hormônios peptídeos. Embora eles possam causar modificações nos constituintes salivares, não podem por si sós, iniciar o fluxo salivar. As células mioepiteliais contraem-se devido aos impulsos tanto do sistema nervoso simpático quanto do parassimpático (EMMELIN, 1987).

Serotonina e Sistema Serotoninérgico (SS)

Dentre os sistemas de neurotransmissão, destaca-se o serotoninérgico (SS), cujo neurotransmissor é a indolamina, denominada 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT). (MANHÃES DE CASTRO, 1995)

A serotonina está presente em muitos outros organismos vivos, desde espécies que possuem SN primitivo até aqueles bastante evoluídos, como o do homem (TURLEJSKI, 1996). O aparecimento precoce na embriogênese do sistema de neurotransmissão serotoninérgica sugere um papel ativo no desenvolvimento neurológico (LEVIT *et al.*, 1997; MORIN, 1999).

A síntese enzimática de 5-HT começa com a hidroxilação do aminoácido 1-triptófano pela triptófano hidroxilase, originando o 5-hidroxitriptófano (5HTP). Esse é em seguida descarboxilado pela descarboxilase dos aminoácidos aromáticos, formando a 5-hidroxitriptamina (5-HT). Os inibidores da síntese da 5HT podem reduzir os estoques endógenos de 5HT nos nervos terminais. A droga inibidora da síntese de 5HT mais freqüentemente utilizada é a p-clorofenilalanina (PCPA). A PCPA inibe a triptófano hidroxilase, a enzima limitante da velocidade de síntese da 5-HT. A atividade da triptófano hidroxilase é aumentada quando neurônios serotoninérgicos são estimulados. Através da monoaminoxidase, a serotonina é metabolizada por oxidação formando o ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA). Inibidores da Monoaminoxidase (IMAO) aumentam a concentração de 5HT nos nervos terminais (HUANG *et al*, 2004). A administração de 1-triptófano e 5-HTP aumenta a concentração de 5HT no cérebro, mas não produz necessariamente aumento na liberação de 5HT na fenda sináptica (HUANG *et al*, 2004). Sendo esta estocada em vesículas sinápticas nas terminações serotoninérgicas, onde serão liberadas por exocitose (FELDELMAN e QUENZER, 1984). Estando na fenda sináptica, a 5-HT interage com múltiplos receptores presentes nas membranas pré e pós-sinápticas (HAMON; EMERIT, 1989). A serotonina pode ser capturada (bomba de recaptção) indo novamente para o interior dos terminais serotoninérgicos. Essa

recaptação tem importante função de cessar a estimulação dos receptores nas sinapses (MANHÃES DE CASTRO *et al.*, 1993).

Os inibidores de recaptura da 5HT impedem essa captura, levando assim ao aumento da concentração de 5HT na fenda (HUANG *et al.*, 1995). Os Inibidores Seletivos de Recaptura da Serotonina (ISRS), como a fluoxetina, citalopram e zimelidina são usados como antidepressivos (SILVEIRA, 2000). O uso de antidepressivos do tipo inibidor da recaptação da serotonina tem aumentado nos últimos anos em neurologia e psiquiatria. Como são drogas de introdução recente, pouco se sabe de seus efeitos secundários precoces e tardios. A Fluoxetina, derivado propilamínico cíclico, é inibidor potente e seletivo da captura de serotonina nas fendas sinápticas do SNC. Possui também efeito anorexígeno (substância que suprime a sensação de fome). A absorção gastrointestinal é efetiva, observando-se o início dos efeitos: entre a 1ª e 4ª semana, sendo os metabólitos excretados por via renal e biliar (HUANG *et al.*, 1998).

Já os Promotores de Liberação de Serotonina (PLS) são drogas que induzem a liberação de serotonina dos terminais - nervosos serotoninérgicos e, indiretamente, através da 5HT liberada, ativam receptores 5HT. Os PLS, para serem eficazes, necessitam, portanto de neurônios serotoninérgicos intactos. Os PLS, p-cloroanfetamina (HUANG *et al.*, 2004), fenfluramina e norafenfluramina, que são substâncias análogas das anfetaminas, podem ser consideradas agonistas serotoninérgicos indiretos. Eles são captados para dentro dos terminais nervosos serotoninérgicos por mecanismos ativos de recaptura, produzindo em seguida liberação de serotonina para a fenda sináptica. A inibição do mecanismo de recaptura da 5HT impede a entrada de PLS para dentro do nervo terminal, opondo-se assim a sua ação (REINECKE, 1997). Visto que o efeito neuroendócrino dos PLS

depende da integridade dos neurônios 5HT, estas drogas podem ser usadas para localizar e identificar os neurônios 5HT que aumentam a secreção de um determinado hormônio. Esta identificação pode ser levada a cabo por uma combinação de técnicas. (HUANG et al, 1995)

As ações da serotonina resultam mais precisamente de sua interação no nível celular, com estruturas moleculares denominadas receptores de membrana, específicos para ela (WHITAKER-AZMITIA, 1991). Estes receptores apresentam grande heterogeneidade e localização pré e pós-sináptica (neste último caso, podem localizar-se em neurônios serotoninérgicos ou não). Através de sua interação com os receptores serotoninérgicos, a serotonina excita ou modula uma ampla variedade de funções do SNC. A atividade serotoninérgica está envolvida na regulação de um número de funções orgânicas como: temperatura; sono; comportamento; apetite aprendido e memória; locomoção; atividade sexual e outras. Conseqüentemente, também está implicada em disfunções, levando a várias patologias, como: ansiedade; depressão; esquizofrenia; desordem compulsiva obsessiva, agressividade; impulsividade, distúrbios do sono, disfunções sexuais e dentre outras (REINECKER, 1997).

Atualmente, no cérebro, são conhecidos 16 diferentes tipos e subtipos de receptores 5-HT (MOSSNER; LESCH, 1998). Entre os tipos e subtipos de receptores da 5-HT, o mais conhecido, bem estudado e caracterizado do ponto de vista farmacológico e bioquímico é o 5-HT_{1A} (HAMON *et al.*, 1989). No SN adulto, a maior densidade cerebral de receptores está nas regiões límbicas, particularmente no hipocampo (giro denteado, CA₁ e CA₃) e no septo lateral, córtex frontal e entorrinal e amígdala central (VERGE *et al.*, 1986, MAGALHÃES, 2000).

Durante o desenvolvimento do cérebro, a serotonina, atuando em seus múltiplos receptores, é possivelmente um fator neuronal trófico (HAMON; EMERIT, 1989). Assim, há grandes variações das ligações específicas de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} em várias regiões cerebrais, no período de desenvolvimento pós-natal. Os sítios de ligação dos receptores 5-HT_{1A} são relativamente abundantes no cerebelo de ratos neonatos e dificilmente detectados em ratos adultos (DAVAL *et. al.*, 1987). Entretanto, nestes mesmos animais, um progressivo aumento destes sítios 5-HT_{1A}, desde o período pós-natal até a fase adulta, é encontrado no giro denteado no hipocampo e no córtex cerebral (DAVAL *et. al.*, 1987, MAGALHÃES, 2000). Além disso, alta densidade de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} são observados no lobo occipital de cérebros de fetos de macacos. Estes receptores parecem estar envolvidos no estímulo à proliferação de neurônios corticais durante o período de crescimento nestes animais (DAVAL *et. al.*, 1987). Portanto, os receptores serotoninérgicos poderiam também atuar como sinalizadores do desenvolvimento de diversas estruturas do sistema nervoso, particularmente aquelas estruturas associadas com funções nas quais a serotonina desempenha um papel como neurotransmissor ou neuromodulador.

Estudos experimentais demonstraram que o tratamento com ISRS, provoca malformações crânio faciais em camundongos no período embrionário entretanto não existem dados morfológicos e morfométricos sobre possíveis efeitos de ISRS no período pós-natal de desenvolvimento crânio-facial e sobretudo sobre as glândulas salivares (HUANG, et al 2004)

No que se refere aos efeitos diretos dos ISRS na morfologia das glândulas submandibulares, na literatura pesquisada, não foi encontrado nenhum trabalho enfatizando esta interação. O que sugere a necessidade de se empreender estudos

desta natureza a fim de estabelecer os padrões morfológicos relacionados aos efeitos acarretados pelo uso de substâncias como ISRS.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a morfologia e as possíveis alterações morfométricas nas glândulas submandibulares em ratos tratados com Inibidor Seletivo de Recaptura da Serotonina - ISRS com 22 e 75 dias de vida pós-natal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar a evolução ponderal nos períodos pré - determinados com as datas de sacrifício dos ratos e das glândulas salivares submandibulares.
- Analisar a estrutura histológica dos ácinos e dos ductos estriados.
- Mensurar morfometricamente as áreas e os perímetros dos ácinos e dos ductos estriados.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve como delineamento um estudo experimental em animais de laboratórios.

População do Estudo

Após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Ratos da linhagem Wistar, do biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE, foram mantidos em condições controladas de luminosidade, 12 horas de luz (ciclos de claro - 6:00 às 18:00h e escuro - 18:00 às 6:00h) e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo, à vontade, água *ad libitum* e dieta padrão do biotério (ração comercial LABINA – Purina do Brasil S/A), durante todo o experimento.

Ao término deste período, para detectar eventual gravidez, as fêmeas eram separadas dos machos e pesadas, através da Balança Marte, modelo S-000 (capacidade para 4Kg). Após confirmação diagnóstica de prenhez, através de aferição diária do peso corporal das fêmeas, as ratas gestantes eram separadas individualmente em gaiolas-maternidades. Nestas gaiolas-maternidades as ratas permaneceram durante toda a gestação até o momento do parto e, junto às ninhadas, até o desmame (21 dias).

Os 16 (dezesseis) animais que foram obtidos são *Rattus norvegicus albinus*, machos, da linhagem Wistar, que foram separados eqüitativamente em 04 (quatro) grupos, de acordo com o que se segue:

- **Grupo Experimental (GE)** – Este grupo foi composto por 08 (oito) animais separados em 02 (dois) subgrupos (cada um em gaiolas contendo até 04 animais), que foram submetidos diariamente, a partir do primeiro dia pós-natal, à ingestão de fluoxetina a 10 mg/Kg, no volume de 10µl/g de peso¹, por via subcutânea (SC). Sendo que, o primeiro subgrupo foi sacrificado com 22 dias, o segundo com 75 dias após o primeiro dia pós-natal.
- **Grupo Controle (GC)** – Este grupo foi composto por 08 (oito) animais separados em 02 (dois) subgrupos (cada um em gaiolas contendo até 04 animais), que foram submetidos diariamente, a partir do primeiro dia pós-natal, à ingestão de solução salina (0,9% de NaCl) a 10 mg/Kg, no volume de 10µl/g de peso, por SC. Sendo que, o primeiro subgrupo foi sacrificado com 22 dias, o segundo com 75 dias após o primeiro dia pós-natal.

Peso Corporal

Neste estudo, a avaliação do controle ponderal foi aferida através do peso corporal de cada animal, apenas no momento do sacrifício (22 e 75 dias). Para isto,

¹ Este volume foi escolhido com base nos trabalhos de Deiró (1998)

foi utilizada a balança digital da marca Marte modelo S-000 com capacidade para 4Kg.

Obtenção das Amostras

Nas idades acima mencionadas, cada rato foi anestesiado através de inalação excessiva de uretano e cloralose. Após ter sido anestesiado, em seguida, o animal foi colocado em uma bandeja contendo no fundo uma camada de parafina solidificada (mesa de vivisseção) e imobilizado pelas patas através de alfinetes, conseguindo com esta manobra que o animal permaneça em decúbito dorsal para posterior remoção das glândulas submandibulares.

O próximo passo realizado foi a tricotomia (tesoura reta de ponta romba) seguida da incisão da pele e posteriormente uma divulsão na altura do pescoço, onde possibilitou visualizar em ambos os lados as glândulas submandibulares.

Neste momento, realizou-se cuidadosamente a exérese das glândulas submandibulares, separando-as dos tecidos adjacentes, para posteriormente serem avaliadas quanto ao peso e a histomorfometria das glândulas submandibulares.

Pesagem das Glândulas Submandibulares

Após o sacrifício, a massa fresca das glândulas submandibulares foi lavada em água destilada e secada em papel de filtro, sendo colocada logo a seguir, em uma balança digital (modelo Bosh, HR-200, com sensibilidade até 0,1 mg) para serem pesadas e avaliadas individualmente.

Processamento Histológico das Glândulas Submandibulares

Após a pesagem das glândulas submandibulares, estas foram colocadas em recipientes (frascos com boca larga), devidamente identificados, contendo solução fixadora. A solução fixadora utilizada foi o formol a 10%, cujo volume foi 50 vezes maior que o volume total da peça, permanecendo assim por 24 horas.

Decorrido este período, as glândulas foram seccionadas em seu maior eixo e logo depois em três seguimentos eqüidistantes em cortes perpendiculares a este eixo, onde os dois segmentos externos foram desprezados, sendo aproveitado apenas o segmento do meio. Ao final deste procedimento procedeu-se a lavagem em água corrente por 40 minutos.

Depois da lavagem os fragmentos foram submetidos a desidratação em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%, por 40 minutos em cada um).

Após a desidratação, o álcool etílico foi substituído pelo xilol (xilol I e II, por 40 minutos em cada), para que os fragmentos das glândulas submandibulares, tornassem translúcidas, etapa esta denominada de diafanização ou clareamento.

A partir da diafanização, estes fragmentos das glândulas submandibulares foram impregnados em parafina líquida na estufa (marca Fanem) a uma temperatura de $58^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo submetidas ainda a mais dois banhos, por um período de 40 minutos cada.

O processamento histológico segue com a colocação das glândulas em recipientes de forma retangular, contendo um pouco de parafina fundida. No fundo de cada recipiente foram colocados dois fragmentos das glândulas submandibulares de cada animal, sendo que um fragmento teve o corte do eixo longitudinal voltado para o fundo, enquanto o outro corte voltado para o lado do centro do recipiente.

Microtomia e Confecção das Preparações Histológicas

A seguir, no Laboratório de Microtomia do Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIO CRUZ/PE, os blocos de parafina contendo os tecidos incluídos foram seccionados em um micrótomo (marca Leica RM 2125 RT) pela navalha descartável (Leica 818 de aço inoxidável - Germany), obtendo-se cortes semi-seriados de $6\mu\text{m}$ com espaçamento de $90\mu\text{m}$.

Ao final da microtomia obtiveram-se 08 cortes em cada bloco de parafina, que foram estirados em banho-maria histológico (marca AO) e dispostos sobre lâminas previamente albuminadas (albumina de Mayer⁶). Obtendo-se um total de 32 lâminas e em cada lâmina 04 cortes por animal totalizando 128 cortes, que permaneceram na estufa (marca Fanem) por 30 minutos a $58^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para retirada do excesso de

⁶ Utilizada para fixar os cortes histológicos oriundos do banho-maria. Constituído por clara de ovo (50 cc); Glicerina (50 cc) e cristal de timol (1 unidade).

parafina e secagem da preparação.

Após todo o procedimento descrito acima para estudos histológicos e morfométricos, foram obtidos 04 cortes histológicos por lâmina (por bloco) e 02 lâminas por animal e estas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina. Conforme quadro 01.

QUADRO 1 – Composição das amostras obtidas

Grupos de Animais	Animais por grupo	Cada bloco duas lâminas	Quatro corte por lâminas	Quatro imagens dos ácinos por corte	Quatro imagens dos ductos por corte
GC 22	04	08	32	128	128
GC 75	04	08	32	128	128
GE 22	04	08	32	128	128
GE 75	04	08	32	128	128
TOTAL	16 Animais	32 Lâminas	128 cortes por Lâminas	512 imagens dos ácinos	512 imagens dos ductos

Análise histomorfométrica

Para a análise dos parâmetros morfométricos, empregou-se um microscópio (Leika – DMLS) com uma microcâmera acoplada (Sansug – color digital, SHC – 410 NAD – HL), conectados a um computador (PC – Pentium II – 200 MHZ). Neste computador se encontra instalados uma placa de captura de imagens (PixelView) e o programa Image-LAB do mestrado em Anatomia Patológica na área de concentração em Morfologia Aplicada – UFPE, programa este capaz de capturar imagens de lâminas histológicas e de realizar morfometria.

Para a análise digital de imagens foram obtidos a área (μm^2) e perímetro (μm) médios dos ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares.

Para cada animal foram confeccionadas 02 lâminas e em cada lâmina foram disponibilizados 04 cortes, e em cada corte foram capturadas 04 imagens tanto para os ácinos quanto para os ductos, totalizando 1024 imagens capturadas sendo 50 % para ácinos e 50 % para ductos.

Análises Estatística

As comparações entre peso das glândulas e o peso dos grupos tratados e respectivos controles foram realizados pelo teste *t* de student e o de Tukey, para analisar a relação entre áreas e perímetros dos ácinos e ductos foi realizado o Man – Whitney U após a confirmação da normalidade das distribuições.

RESULTADOS

RESULTADOS

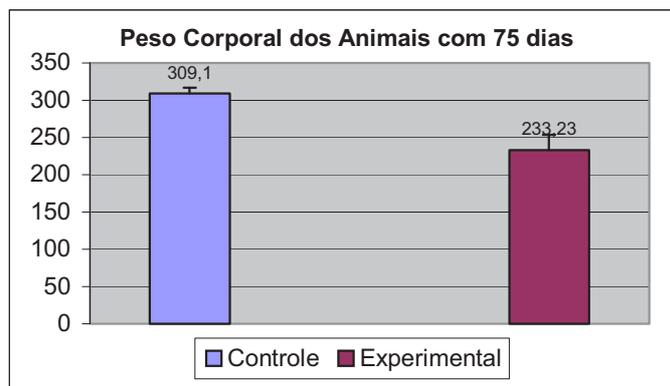
MEDIDAS PONDERAIS

As medidas ponderais avaliadas foram o peso corporal médio e o peso úmido das glândulas submandibulares esquerda e direita.

PESO CORPORAL

O peso corporal médio dos ratos entre os grupos estudados exibiram diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ apenas no GE 75 menor quando comparado ao controle (GC 75) (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 - PESO MÉDIO CORPORAL DE RATOS (75 DIAS)

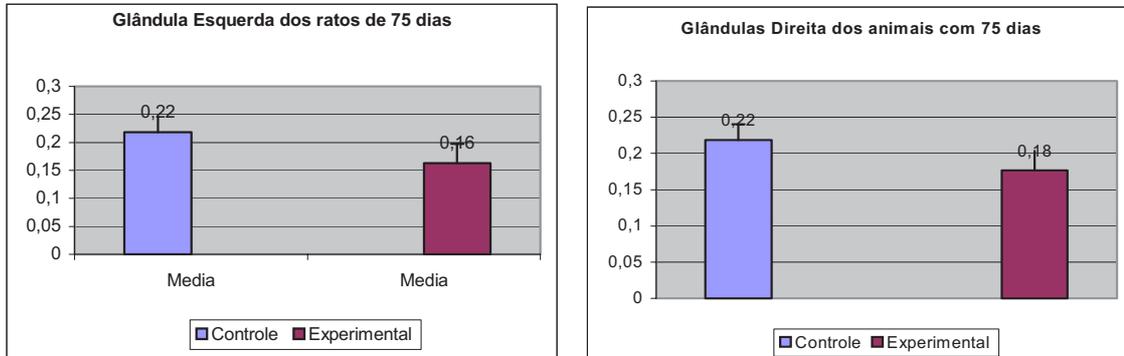


PESO GLANDULAR

Quanto ao peso médio das glândulas submandibulares, não ficou evidenciada diferença entre as glândulas esquerda e direita em nenhum dos grupos estudados (GC22, GE22, GC75 e GE75).

Entretanto, quando se comparou isoladamente as glândulas submandibulares esquerda ou direita entre os grupos experimentais em diferentes períodos de tratamento (GE22 e GE75) e grupos controle (GC22 e GC75) pode-se observar uma diferença estatística entre os grupos com 75 dias de tratamento (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – PESO MÉDIO DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR ESQUERDA DE RATOS (75 DIAS)

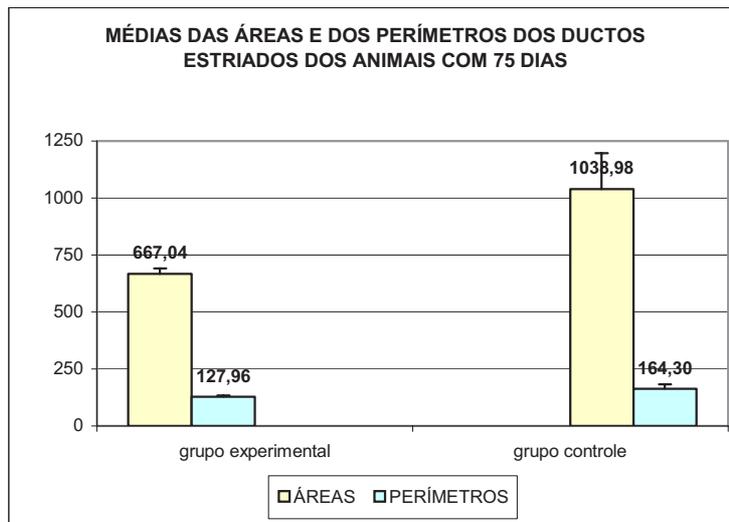


ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Não se observaram diferenças significantes entre a área e o perímetro tanto dos ductos quanto dos ácinos quando comparada a lateralidade das glândulas.

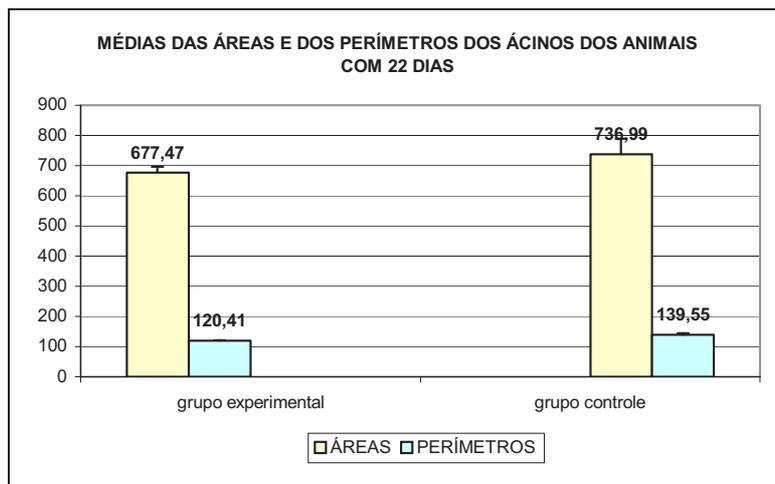
Quando se comparou o grupo experimental (GE22) e seu controle (GC22), constatou-se que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na área (GRÁFICO 3) e perímetro dos ductos estriados nos animais tratados com fluoxetina.

GRÁFICO 3 – MÉDIAS DAS ÁREAS E DOS PERÍMETROS DOS DUCTOS ESTRIADOS SEGUNDO OS GRUPOS EXPERIMENTAL E CONTROLE DOS ANIMAIS COM 75 DIAS.



No que se refere aos ácinos glandulares, durante o mesmo período de tempo (22 dias), não se observaram diferenças estatisticamente significantes (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 - MÉDIAS DAS ÁREAS E DOS PERÍMETROS DOS ÁCINOS SEGUNDO GRUPOS EXPERIMENTAL E CONTROLE DOS ANIMAIS COM 22 DIAS.



Após 75 dias de tratamento observou-se uma importante redução ($p < 0,05$) da área e perímetro médios tanto dos ductos estriados como dos ácinos glandulares no grupo experimental (GE 75) quando comparado ao controle (GC 75) (GRÁFICO 5 e 6).

GRÁFICO 5 - MÉDIAS DAS ÁREAS E DOS PERÍMETROS DOS DUCTOS ESTRIADOS SEGUNDO OS GRUPOS EXPERIMENTAL E DE CONTROLE DOS ANIMAIS COM 75 DIAS.

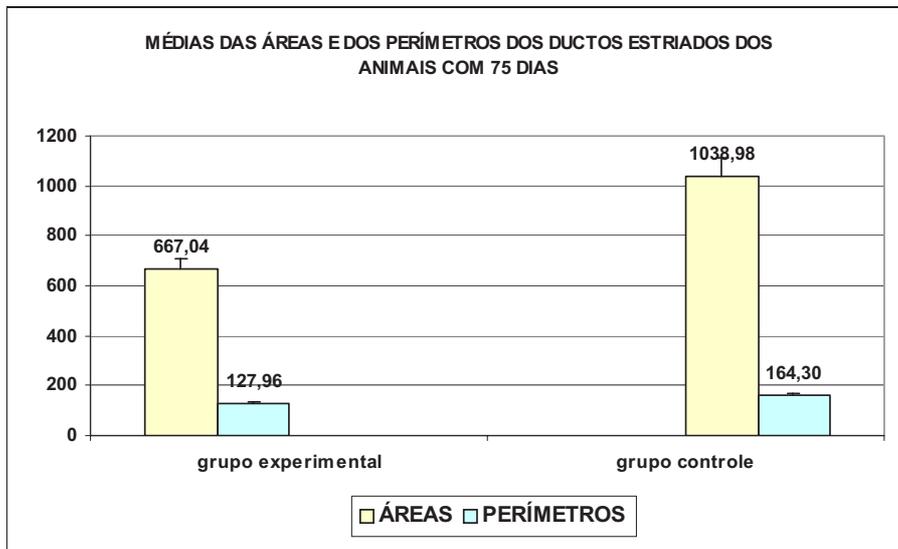
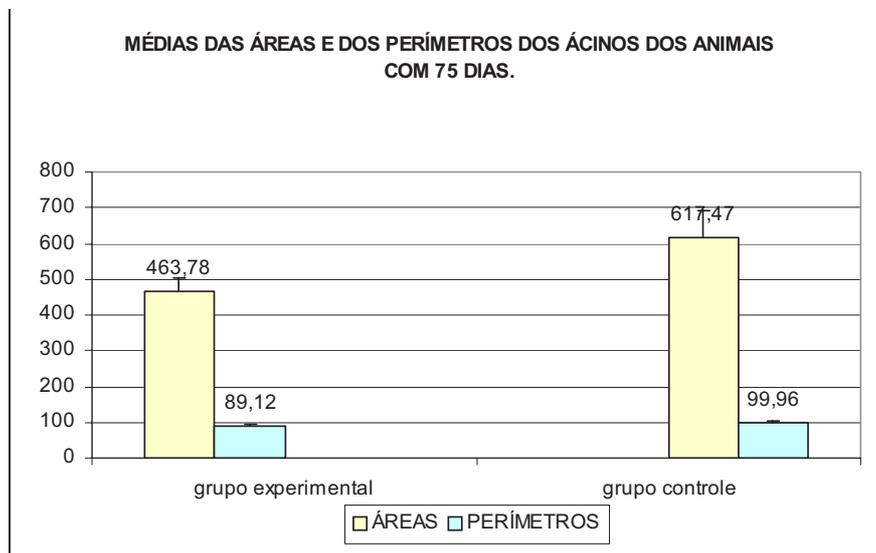


GRÁFICO 6 - MÉDIAS DAS ÁREAS E DOS PERÍMETROS DOS ÁCINOS SEGUNDO GRUPOS EXPERIMENTAL E CONTROLE DOS ANIMAIS COM 75 DIAS.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A morfofisiologia das glândulas salivares tem sido extensivamente investigada em diversas espécies de vertebrados, tendo os mamíferos recebido atenção especial. Um expressivo número das principais características bioquímicas, ultraestruturais e moleculares acham-se estabelecidas (PINKSTAFF, 1980). Entretanto um número bem maior de questões a serem respondidas permanece como alvo das atenções de pesquisas multidisciplinares.

A origem das glândulas salivares ocorre a partir das interações entre o ectoderma bucal e o mesênquima subjacente (KIM, 1994) prosseguindo o desenvolvimento durante os períodos embrionário e fetal, e atingindo o estágio final, em várias espécies, somente após o nascimento.

Os mais diversos aspectos do desenvolvimento pós-natal vêm sendo estudados principalmente em roedores. Na maioria das espécies já estudadas, o desenvolvimento das glândulas salivares só se completa em torno do 30-40 (trigésimo – quadragésimo) dia de vida pós-natal (REEDMAN e SREEBNY, 1971; TAGA e SESSO, 1978; SREEBNY, 1987; FERREIRA, 1994). Tal fato tem possibilitado o estudo dos diversos fatores envolvidos nestes processos que regulam e modulam a diferenciação e o crescimento, em níveis celular e molecular. Cabe destacar a descoberta do NGF (Nerve Growth Factor) por Rita Levi-Montalcini, agraciada com o Nobel.

Hormônios, fatores de crescimento, citocinas e aminas biogênicas são as principais classes de substâncias envolvidas em complexos eventos que controlam a morfogênese. Dentre as aminas biogênicas, a serotonina (5-hidroxitriptamina), tem um papel destacado principalmente na morfogênese da região crâneo-encefálica

(MAGALHÃES, 2000). Assim as investigações sobre a serotonina e de substâncias que interferem no seu metabolismo são de fundamental importância para uma melhor compreensão do desenvolvimento pós-natal que ocorre nestas glândulas.

Estudos experimentais sobre efeitos secundários provocados pela administração de ISRS durante períodos críticos do desenvolvimento têm mostrado o aparecimento de malformações crânio-faciais em camundongos (MAGALHÃES, 2000), contudo em relação à glândula submandibular não foi encontrado nenhum estudo morfoquantitativo com esta abordagem.

Os achados morfométricos no presente estudo apresentam-se mais significantes com relação aos animais com 75 dias. Nos tratados com ISRS ocorreu uma redução estatisticamente significativa tanto na área e perímetro das unidades secretoras, quanto na área e perímetro dos ductos. Depreende-se destes dados, que as ações são mais efetivas neste período provavelmente por uma maior sensibilidade dos tecidos glandulares às drogas. É lícito supor e sugerir que esta sensibilidade possivelmente está correlacionada com os dados reportados por Bruschi (1987), o qual observou que em camundongos machos a diferenciação glandular, ácinos e ductos, completa-se em torno do 40º dia.

Recentemente, reforçando o que os achados do presente trabalho de HUANG et al. (2004), detectaram serotonina e o receptor 5-HT_{1A} em glândula submandibular de rato usando imunocitoquímica e hibridização *in situ*, mostrando ainda que o conteúdo de ambos aumenta gradualmente durante os primeiros 60 dias de vida após o nascimento. Os referidos autores sugerem a existência de um modo de ação autócrina para 5-HT. Além disto em estudo prévio Hendry (1971) já demonstrara que os níveis de NGF aumentam significativamente após o nascimento. Se aos 60 dias quantitativamente os receptores para serotonina atingem a concentração

equivalente aquela do animal adulto, uma resposta mais efetiva à ação da Fluoxetina ocorrerá.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

- O tratamento crônico com ISRS, durante o período neonato reduz o crescimento ponderal de ratos durante a fase de desenvolvimento.
- A diminuição das glândulas submandibulares sofreram a ação do tratamento crônico neonatal com ISRS, demonstrando através da diminuição dos parâmetros avaliados. É possível que este atraso seja devido à ação trófica da 5-HT durante o desenvolvimento do SN.
- Devido as alterações somato-neurais encontradas em nosso estudo, recomenda-se maiores cuidados na utilização de ISRS (antidepressivos), provoca alterações na formação de organismos jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARES, E. e SESSO, A. Cell proliferation, differentiation and transformation in the rat submandibular gland during early postnatal growth. A quantitative and morphological study. **Arch. Histol. Jap.**, V.38, p.177-208, 1975.

ANDREW, W. – A comparison of age changes in salivary glands of man of the rat. **J. Gerontol.**, V.7, p.178 – 190, 1952.

ANDREW, W. – Age changes in the salivary glands of wistar institute rats with particular reference to the submandibular glands. **J. Gerontol.**, V.4, p.95 – 103, 1949a.

ARAUJO, N. S. *et.al.* Estudo histopatológico e imunohistoquímico do mioepitelioma da glândula salivar. **Ver. Odont. USP** V.4 n.1, p.62-6. Jan./Mar. 1990.

BALL, W. D.: Development of the rat salivary glands. III Mesenchymal specificity in the morphogenesis of the embryonic submaxillary and sublingual glands of the rat. **J. Exp. Zool**, p.188 - 277, 1974.

BARNES, N. M., SHARP, T. – A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol.** V.38, p.1083 – 1152, 1999.

BATSAKIS, J. G. Myoepithelioma. **Ann Otol. Rhinol. Laryngol.** V.94, p.523-4, 1985.

BERTRAM, U. – Xerostomia. **Acta odont. Scand.**, V.25 (suppl), p. 49, 1967.

BRUSCHI, L. C. Desenvolvimento pós-natal das glândulas submandibulares de camundongos machos e fêmeas: estudo histológico, histométrico e histoquímico. 1987.

CAVALLAZZI, L. O. e GREZESIUK, A. Síndrome serotoninérgica associada ao uso de paroxetina. **Arq Neuropsiquiatr**; V.57, n3-B, p.886 - 889, 1999.

CHOPIN, P., ORET, C., BRILEY, M. – Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine 1 B/D receptor ligands. **Pharmacology ther.** V.62, p.385, 1994.

COSSA, M., PERRA, M. T., LANTINI M. S. – Subcellular localization of epidermal growth factor in human submaxillary gland. **Histochem J.** V.32, n5, p.291-294, 2000.

CUTLER, I. S.: Functional differentiation of salivary glands. In Forte J (ed): Salivary, pancreatic, gastric, and hepatobiliary secretion, **American Physiological Society Press** V.3, New York, 1989,.

CUTLER, I. S.; CHAUDHRY, A. P.: Differentiation of the myoepithelial cells of the rat submandibular gland in vivo and vitro: an ultrastructural study, **Journal Morphol**, V. 140, p. 343, 1973.

CUTLER, L. S. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of a salivary gland. **Developmental Biology**, V.4, p.27, 1990.

DANIELS, P. J. et al. – Cytokine-mediated stimulation of laminin expression and cell-growth arrest in a human submandibular gland duct-cell line (HCG). **Arch. Oral Biol.** V.44, n7, p.603 - 615, 1999.

DAWES, C.; WEATHERELL, J. A. Kinetics of fluoride in the oral fluids. **J. Dents. Res.**; V.69 (spec Issue), p.638 - 44, 1990.

DEIRÓ, P. C. B. J. et al. – Neonatal treatment with fluoxetine delays the somatic maturation and reflex ontogeny. Submitted to **Pharmac. Biochem Behav.** USA, 2004.

DOINE, A. I.; OLIVEIRA, C. e HAND, A. R. The golgi apparatus and GERL during postnatal differentiation of rat parotid acinar cells: an electron microscopic cytochemical study. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, V.32, p.477, 1994.

EMMELIN, N. Nerve interactions in salivary glands. **J. Dent. Res.**, V.66, p. 509-517. 1987.

FELDELMAN, R. S., QUENZER, L. F. Serotonin. **In: Fundamentals of neuropsychopharmacology.** **Snauer.** 1984.

FERREIRA, R. R.; ASSIS, G. F. e TAGA, R. – Estudo morfométrico da evolução do volume nuclear e citoplasmático e da relação citoplasma/núcleo de células acinosas de glândulas parótidas do rato durante a vida pós-natal. **Ver. Bras. Ciên. Morfol.** São Paulo. V.11; n 2; Jul./Dez. 1994.

GARRET, J. R. e EMMELIN, N. Activities of myoepithelial cells: a review. **Med. Biol.**, V.57, p. 1-28, 1979.

GARRET, J. R. : The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. **Microscopy Research and Technique** p.26 - 75, 1993.

HENDRY, I. A. – Developmental changes in tissue and plasma concentration of the biologically active species of nerve growth factor in mouse, by using a two-sites radioimmunoassay. **Biochem J.** V.128, n10, p.1265, 1971.

HOYER, D. et al. Interaction union of classification of receptors for 5 – hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.** V.46, p.157, 1994.

HUANG, W. et al – Localization and in situ quantification of 5-hydroxytryptamine and its receptor in rat submaxillary gland. **Journal of molecular histology**, V. 35, p. 47-53, 2004.

HUANG, W. Q. et al. – Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. **Placenta.** V.19, n5, p.655 - 661, 1998.

HUANG, W. Q., et al. –Identification of homemade antiserotonin anti-idiotypic antibody with immunohistochemical method and localization of serotonin receptors. **J. Fourth Milit. Univ.** V.16 ,n2, p.195 - 198, 1995a.

JACOB, F. e LESSON, C. R. The post-natal development of the rat submaxillary gland. **J. Ant.** V.93, p.201-6, 1959.

JASKOLL, T. MELNICK, M. – Submandibular gland morphogenesis: Stage-specific expression of TGF- alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta-2, TGF-beta-3, and EGF- γ null mutations. **Anat. Rec.** V.256, n3, p.253 – 256, 1999.

KIM, S. K. et al: Structural and functional changes in salivary gland during aging. **Microsc Res. Tech.** V.28, p. 243, 1994.

LEVIT, P. et al. – New evidence for neurotransmitter influences on brain development. **Trends neurosci.** V.20, p.269 – 274, 1997.

Magalhães, C. P. – Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recapture da serotonina sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. **Dissertação: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.** Recife, 2000.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. – Métodos quantitativos em morfología. Rio de Janeiro, **EDUERJ**, p.1 – 131, 1995.

MANDEL, I. D. Oral defenses and disease: salivary gland function. **Gerodontology.** V.3, p.47-54, 1984.

MANDEL, I. D. The functions of saliva. **J. Dent. Res.** V.66(Spec Issue), p. 623-7, 1987.

MANGOS, J. A.; McSHERRY, N. B.; NOUSIA-ARVANITAKIS, D. – Autonomic regulation of secretion and transductal fluxes of ions in the rat parotid. **Am. J. Physiol.**, V.225, p. 683-8, 1973.

MANHÃES DE CASTRO, R. et al. – Neonatal treatment with naloxone causes permanent hyperalgesia in rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** V.26, p.747 – 751, 1993.

MARTINEZ-MADRIGAL, F. e MICHEAU, C. – Histolgy of the major salivary glands. **Am. J. Surg. Pathol.**, V.13, p. 879-899, 1989.

MASON, D. K. e CHISHOLM, D. M. Salivary glands in health and disease. **London, Saunders**, 1975.

MORITA K., NOGAWA H. – EGF-dependent bule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium *in vitro*. **De. Dyn.** V.215, n2, p.148 – 154, 1999.

PARDINI, C. L. e TAGA, R. Morphometric study of acinar cell development of mouse submandibular glands during the post natal period. **Rev. da FOB**, V.1 n 1/4, 2000.

PINKSTAFF, C. A. Serous, seromucous, and special serous cells in salivary glands. **Microscopy Research and Technique**. p.26 - 21, 1993.

PINKSTAFF, C. A. The cytology of salivary glands. **International Review of Cytology**, V.63, p.141, 1980.

REEDMAN, E. W. Myoepithelium of salivary glands. **Microscopy Reserch and Tecnique**. p.27 - 25, 1993.

REEDMAN, R. S. e SREEBNY, L.M. –Morphologic and biochemical observations on the development of the rat parotid gland. **Develop. Biol.** V.25, p. 248-279, 1971.

REINECKE M., MULLER C. e SEGNER, H. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *scophthalmus maximus* (teleostei). **Anat Embryol.** (Berl) V.195, n.1, p.87-101, 1997.

RIVA, A.; LANTINI, M. S. e TESTA RIVA, F. Normal human salivary glands. In: *Ultrastructure of the extraparietal glands of the digestive tract*. A. Riva e P. M. Motta eds. Kluwer **Academic Publishers, Boston**. p.53, 1990.

SCOTT, J. – A morphometric study of age changes in the histology of the ducts of human submandibular salivary glands. **Archs Oral Biol.**, V.22, p.243 - 249, 1977.

SHEFLIN L. G., et al. – Increased epidermal growth factor expression produced by testosterone in the submaxillary gland of female mice is accompanied by changes in poly-A tail length and periodicity. **Endocrinology**. V.137, n5, p.2085 – 2092, 1996.

Silveira, A. B. – Estudo histológico e morfométrico do jejuno de ratos com 14 e 21 dias de vida pós-nata, tratados com inibidor seletivo de recaptura da serotonina (ISRS). **Dissertação: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, 2000.

SREEBNY, L. M. Xerostomia. A neglected symptom. **Arch Intern Med**; V.147, p.1333-7, 1987.

TAGA, R. e SESSO, A. – Avaliação do número de células de órgãos pela dosagem bioquímica de DNA em homogeneização e por contagem direta através de métodos morfométricos. *Ciênc. E Cult.*, V.30, p.1232-1236, 1978.

TAGA, R. e SESSO, A. Postnatal development of the rat sublingual glands. A morphometric and rediautographic study. *Archives of Histology and Cytology*, V.61, p.417, 1998.

TAGA, R.; PARDINI, L. C.; UCHÔA, A. S. Morphometric evaluation of the length of the striated ducts in the rat submandibular glands. *Rev. Bras. Ciên. Morf.*, V.10, n.2, p. 93-97, 1993.

TAGA, R. e SESSO, A. – Ultrastructural studies on developing parotid gland of the rat early post-natal periods. *Arch. Histology. Jap.*, V.42, p.427 - 444, 1979.

TANDLER, B. e PHILLIPS, C. J. Structure of serous cells in salivary glands. *Microscopy Research and Technique*. V.26, p.32, 1993.

TANDLER, B. Structure of mucous cells in salivary glands. *Microscopy Research and Technique*. V.26, p.49, 1993.

TANDLER, B. Structure of the duct system in mammalian major salivary glands. *Microscopy Research and Technique*. V.26, p.57, 1993.

TANDLER, B. Ultrastructure of the human submaxillary gland. II. The base of the striated duct cells. *J. Ultrastruct. Res.* V.9, p.65 - 75, 1962.

TORN J. J., PRAUSE J. U., OXHOLM, P. Sialochemistry in Sjögren's syndrome: a review. *J. Oral Pathol Med*. V.18, p.457 - 68, 1989.

TURLEJSKI, K. – Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol. Experimentalis*. V.56, p.619 – 636, 1996.

WHITAKEN-AZMITIA, P. M. – Role of serotonin and other neurotransmitter receptor in brain development: basis for developmental pharmacology signal. *Pharmacol. Rev.* V.43, n4, p.553 – 561, 1991.

WHITAKEN-AZMITIA, P. M. – The discovery of serotonin and its role in neuroscience. **Neuropsychopharmacol.** V.21, p.25 – 85, 1999.

WHITAKEN-AZMITIA, P. M., MRUPHY, R., AZMITIA, E. C. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. **Brain. Res.** V.528, p.155 – 8, 1990.

YAMANO S., et al. – Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/C mice. **Clin. Immunol.** V.92, n3, p.265 – 275, 1999.

YONEMURA Y. et al – Tissue status of epidermal growth factor and its receptor as an indicator of poor prognosis in patients with gastric cancer. **Anal Cell Pathol**, V.3, n6, p.343 – 350, 1991.

YOUNG, J. A. *et al*: A microperfusion investigation of sodium resorption and potassium secretion by the main excretory duct of the rat submaxillary gland. **Pfluegeres Arch**; V.295, p.157, 1967.

YOUNG, J. A., VAN LENNEP D. W.: The morphology of salivary glands. **Academic Press, London**, 1978.

ANEXOS

Figuras

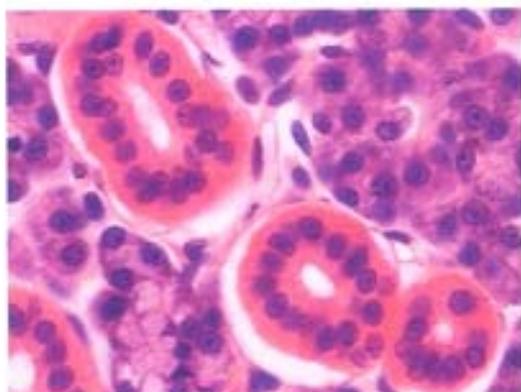


Figura 1 - Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo controle com 22 dias (objetivas de 40x)



Figura 2 - Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo experimental com 22 dias (objetivas de 40x)

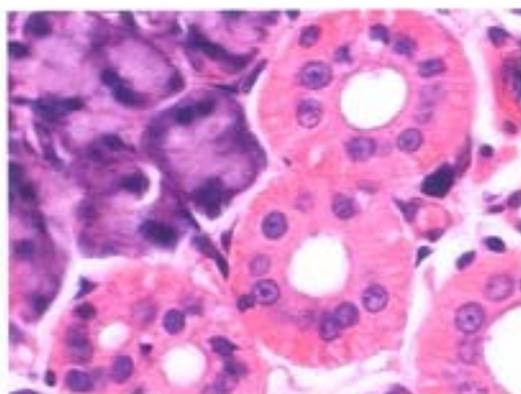


Figura 3 - Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo controle com 75 dias (objetivas de 40x)

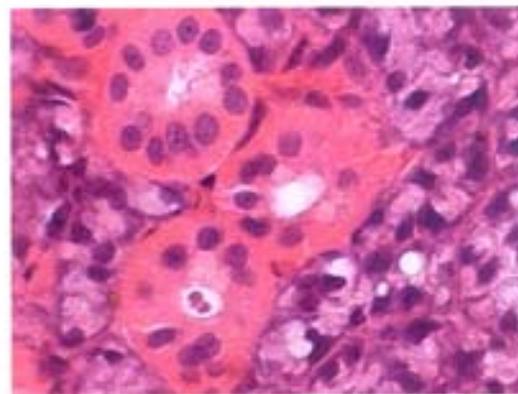


Figura 4 - Ductos estriados e ácinos das glândulas submandibulares do grupo experimental com 75 dias (objetivas de 40x)